

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(54) PRODUCTION OF DIHOMO- γ -LINOLEIC ACID AND LIPID CONTAINING THE SAME

- (11) 5-91887 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-251964 (22) 30.9.1991
 (71) SUNTORY LTD (72) HIROSHI KAWASHIMA(3)
 (51) Int. Cl.⁵. C12P7/64/(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/785)(C12P7/64,C12R1/80)(C12P7/64,C12R1/66)

PURPOSE: To easily produce the subject compound in high efficiency exclusively using inexpensive common medium by cultivating a microbial strain capable of producing arachidonic acid and having lowered or depleted $\Delta 5$ -unsaturation activity.

CONSTITUTION: A microbial strain capable of producing arachidonic acid and having lowered or depleted $\Delta 5$ -unsaturation activity (e.g. mutant of *Mortierella alpina* SAM 1860 (FERM BP-3589)) is cultivated to produce the objective compound or a lipid containing the same. The objective compound can be separated from the lipid e.g. by drying the cultivated microbial cells separated from the cultivation liquid, extracting the cell with an organic solvent under nitrogen gas stream, treating the extract with methanol, etc., extracting the treated product with an organic solvent such as hexane to obtain a mixture of fatty acid esters, separating the ester of the objective compound from the mixture by low-temperature crystallization, etc., and hydrolyzing the ester.

(54) PRODUCTION OF ω -9 HIGHLY UNSATURATED FAITY ACID AND LIPID CONTAINING THE SAME

- (11) 5-91888 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-251966 (22) 30.9.1991
 (71) SUNTORY LTD (72) HIROSHI KAWASHIMA(2)
 (51) Int. Cl.⁵. C12P7/64/(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/785)(C12P7/64,C12R1/80)(C12P7/64,C12R1/66)

PURPOSE: To obtain the subject compound useful as a precursor for leucotriene 3 group using an inexpensive common medium in high efficiency by cultivating a microbial strain capable of producing ω -type highly unsaturated fatty acid.

CONSTITUTION: A microbial strain capable of producing ω -type highly unsaturated fatty acid (e.g. a mutant of *Mortierella alpina* SAM1861 (FERM BP-3590)) is cultivated to produce the objective compound or a lipid containing the objective compound. The objective compound such as 6,9-octadienoic acid is separated from the cultivation product. The cultivation is carried out preferably at 20-30°C and pH 6-9. The objective compound can be separated from the lipid e.g. by extracting the cultivated microbial cells with an organic solvent, treating the obtained lipid containing the ω -9 highly unsaturated fatty acid with methanol, extracting the treated liquid with hexane, etc., to obtain a mixture of methyl esters of various fatty acids, separating various ω -type highly unsaturated fatty acid methyl esters from the mixture by low-temperature crystallization, etc., and hydrolyzing the esters.

(54) PRODUCTION OF OIL AND FAT AND MICROORGANISM THEREFOR

- (11) 5-91889 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-272003 (22) 24.9.1991 (33) JP (31) 91p.216426 (32) 2.8.1991
 (71) SHOWA SANGYO CO LTD (72) TAKASHI YAGI(2)
 (51) Int. Cl.⁵. C12P7/64,C12N1/20/(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/72)

PURPOSE: To facilitate the extraction process and reduce the cost by cultivating a specific yeast in the presence of a fatty acid (alkyl ester), thereby effecting extracellular production of an oil and fat, especially an oil and fat usable as a substitute for cacao fat.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to the genus *Trichosporon*, *Saccharomycopsis*, *Candida* or (*Cryptococcus* and capable of producing an oil and fat out of the microbial cell by the cultivation in the presence of a fatty acid (alkyl ester) (e.g. new microbial strain, *Trichosporon* sp. SH45Y (FERM BP-1236)) is cultivated in a medium containing a fatty acid (alkyl ester), and the produced and accumulated oil and fat is separated from the cultivation liquid. The fatty acid alkyl ester is preferably ethyl palmitate, etc., and the fatty acid is preferably oleic acid, capric acid, etc.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-91888

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/64		8114-4B		
// (C 1 2 P 7/64				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 7/64				
C 1 2 R 1:785)				

審査請求 未請求 請求項の数7(全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-251966

(22)出願日 平成3年(1991)9月30日

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 河島 洋

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社基礎研究所内

(72)発明者 山田 秀明

京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

(72)発明者 清水 昌

京都府京都市中京区西ノ京伯楽町14

(74)代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

(54)【発明の名称】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸およびこれを含有する脂質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の新規な製造方法を提供する。

【構成】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を培養してオメガ9系高度不飽和脂肪酸、又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸又はそれを含有する脂質の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を培養してオメガ9系高度不飽和脂肪酸、又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸の製造方法。

【請求項2】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を培養してオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質の製造方法。

【請求項3】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にこれらの基質を添加してさらに培養することによりオメガ9系高度不飽和脂肪酸、又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸の製造方法。

【請求項4】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩またはこれらを構成成分として含む油脂を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にこれらの基質を添加してさらに培養し、そしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質の製造方法。

【請求項5】 前記オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物が $\Delta 5$ 不飽和化活性および $\Delta 6$ 不飽和化活性を有し、かつ $\Delta 12$ 不飽和化活性の低下または欠失した微生物であることを特徴とする請求項1～4記載のオメガ9系高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

【請求項6】 前記オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物がアラキドン酸生産能を有し、かつ $\Delta 12$ 不飽和化活性の低下または欠失した微生物であることを特徴とする請求項1～4記載のオメガ9系高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

【請求項7】 前記オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物が、モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物であることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載のオメガ9系高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は醗酵法による2つ以上の二重結合を有し、好ましくは炭素数18～22を有するオメガ9系高度不飽和脂肪酸及びこれを含有する脂質の製造方法に関する。

【0002】

【従来技術】 オメガ9系高度不飽和脂肪酸、例えばミード酸、及び8, 11-エイコサジエン酸は必須脂肪酸欠乏に陥った動物組織の構成脂肪酸のひとつとして存在することが知られている。しかしながら、その含量はわずかであるため単離精製はたいへん困難である。また微生物界におけるその存在は、現在のところ全く知られていない。これらの高度不飽和脂肪酸は生体内でロイコトリエン3グループの前駆体になることが可能でその生理活性が大いに期待される。このためオメガ9系高度不飽和脂肪酸を大量に製造する方法を開発することが強く望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明は、安価な常用の培地を用いて効率よくオメガ9系高度不飽和脂肪酸を製造することができる方法を提供しようとするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記目的を達成するため種々研究した結果、本発明において、オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を培養してオメガ9系高度不飽和脂肪酸、又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸の製造方法；及びオメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を培養してオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質の製造方法を提供する。

【0005】 さらに、本発明者は、オメガ9系高度不飽和脂肪酸を生産する能力を有する微生物を、培地又は培養中の培養液にオメガ9系高度不飽和脂肪酸の基質、例えば炭化水素、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪酸塩、又はこれらを構成成分として含む油脂等を添加して培養した場合に、オメガ9系高度不飽和脂肪酸の顕著な生産が認められるという全く新しい知見を得た。

【0006】 従ってこの発明はさらに、オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物をオメガ9系高度不飽和脂肪酸の基質を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にこれらの基質を添加してさらに培養することによりオメガ9系高度不飽和脂肪酸又はオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸の製造方法；及びオメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物をオメガ9系高度不飽和脂肪酸の基質を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にこれらの基質を添加してさらに培養し、そしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を採取することを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有する脂質の製造方法を提供する。

有する脂質の製造方法を提供するものである。

【0007】さらに、本発明者らは、前記製造方法においてオメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物が、 $\Delta 5$ 不飽和化活性および $\Delta 6$ 不飽和化活性を有しかつ $\Delta 12$ 不飽和化活性の低下または欠失した微生物であることを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸又はこれを含む脂質の製造方法；及び前記オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物が、アラキドン酸生産能を有しかつ $\Delta 12$ 不飽和化活性の低下または欠失した微生物であることを特徴とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸又はこれを含む脂質の製造方法を提供しようとするものである。

【0008】

【具体的な説明】本発明の方法においては、オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。さらに具体的には、 $\Delta 5$ 不飽和化活性および $\Delta 6$ 不飽和化活性を有しかつ $\Delta 12$ 不飽和化活性の低下または欠失した微生物、使用することができ、例えばアラキドン酸生産能を有する微生物から誘導される突然変異株を挙げることができる。アラキドン酸生産能を有する微生物としては、モルティエラ (*Mortierella*) 属、コニディオボラス (*Conidiobolus*) 属、フィチウム (*Pythium*) 属、フィトフトラ (*Phytophthora*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、クラドスポリウム (*Cladosporium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ロードトルラ (*Rhodotorula*) 属、エントモフトラ (*Entomophthora*) 属に属する菌株が挙げられる。モルティエラ属では例えば、モルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*)、モルティエラ・エキシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 等のモルティエラ亜属に属する菌株を挙げることができる。突然変異を誘発させるためには、放射線 (X線、ガンマー線、中性子線) 照射や紫外線照射、高熱処理等を行ったり、また微生物を適当なバッファー中などに懸濁し、変異源を加えて一定時間インキュベート後、適当に希釈して寒天培地に植菌し、変異株のコロニーを得るといった一般的な突然変異操作を行うこともできる。変異源としては、ナイトロジェンマスタード、メチルメタンサルホネート (MM S)、N-メチル-N'-ニトロソ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等のアルキル化剤や、5-プロモウラシル等の塩基類似体や、マイトマイシンC等の抗生物質や、6-メルカプトプリン等の塩基合成阻害剤や、プロフラビン等の色素類 (その他の誘導体) や、4-ニトロ

キノリン-N-オキシド等のある種の発がん剤や塩化マンガン、ホルムアルデヒド等のその他の化合物を挙げることができる。また使用する微生物は、生育菌株 (菌糸など) でも良いし、胞子でも良い。またモルティエラ属の変異株では例えば、本発明者らが誘導した突然変異株モルティエラ・アルピナ SAM1861 (微工研菌条第3590号) を使用することができる。

【0009】オメガ9系高度不飽和脂肪酸を有する微生物を培養して得られるオメガ9系高度不飽和脂肪酸は、例えば6, 9-オクタジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、5, 8, 11-エイコサトリエン酸 (ミード酸) 等を挙げることができる。本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の胞子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステイプリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他に必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の成育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1~30重量%、好ましくは1~10重量%、窒素源は0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのが良い。

【0010】培養温度は5~40℃、好ましくは20~30℃とし、培地のpHは4~10、好ましくは6~9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2~10日間行う。固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50~100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5~40℃、好ましくは20~30℃の温度において、3~14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。また、本発明においては、オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物の培地中に、オメガ9系高度不飽和脂肪酸の基質を添加して培養することにより、オメガ9系高度不飽和脂肪酸の蓄積を促進することもできる。テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸等の脂肪酸又はその塩 (例えばナトリウム塩、カリウム塩等) 及びエステル、又は脂肪酸が構成成分として含まれる油脂 (例えば、オリーブ油、ヤシ油、綿実油) 等を挙げることができるが、これらに限られるものではない。基質の総添加量は培地に対して0.001~10重量%、好ま

しくは0.5～10重量%である。これらの基質は生産微生物を接種する前又はその直後に加えてもよく、又は培養を開始した後に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。又、これらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

【0011】このようにして培養して、菌体内にオメガ9系高度不飽和脂肪酸を大量に含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、例えば、次のようにしてオメガ9系高度不飽和脂肪酸の採取を行う。培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のオメガ9系高度不飽和脂肪酸を含有した脂質が得られる。

【0012】また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。メタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び/又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。上記のようにして得られた脂質中には、各種オメガ9系高度不飽和脂肪酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えば8,11-エイコサジエン酸メチル、9,12-オクタジエン酸メチル、ミード酸メチル等として分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸等（これらも、オメガ9系高度不飽和脂肪酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、オメガ9系高度不飽和脂肪酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水エタノール-塩酸5～10%、BF₃-メタノール10～50%等により、室温にて1～24時間処理するのが好ましい。

【0013】前記の処理液からオメガ9系高度不飽和脂肪酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテ

ル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルからなる混合物が得られる。この混合物中には、目的とするオメガ9系高度不飽和脂肪酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等の脂肪酸メチルエステルが含まれている。これらの脂肪酸メチルエステル混合物からオメガ9系高度不飽和脂肪酸メチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接法、液々交流分配クロマトグラフィー等を単独で、又は組み合わせで使用することができる。

【0014】こうして単離された各種オメガ9系高度不飽和脂肪酸メチルからオメガ9系高度不飽和脂肪酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。又、オメガ9系高度不飽和脂肪酸をそのメチルエステルを経ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2～3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

【0015】次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

【0016】

【実施例】

実施例1. グルコース2%または4%及び酵母エキス1%を含む培地(pH6.0)2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) の突然変異株SAM1861を培地に1白金耳接種し、レシプロシェーカー(110rpm)により、12℃、20℃、28℃の3種類の温度で10日間培養した。

【0017】培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、遠心エバポレーター(60℃、2時間)で乾燥させ、そして、塩化メチレン2ml、無水メタノール-塩酸(10%)2ml加え、50℃で3時間処理することによってメチルエステル化し、n-ヘキサン4ml、水1mlを加え、2回抽出し溶媒を遠心エバポレーター(40℃、1時間)で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表1にその結果を示す。

【0018】

【表1】

表 1

モルティエラ・アルピナSAM1861

培養 温度 (℃)	グルコース 濃度 (%)	生育度 (g/l)	ω 9 PUFA生産量 (g/l)		* 脂肪酸組成 (%)													
			18:2 (ω9)	20:3 (ω9)	16:0	18:0	18:1	LA (ω9)	18:2 (ω9)	GLA	20:1	20:2	20:2 (ω9)	20:3 (ω9)	DGLA	Ara	EPA	24:0
12	2	11.1	0.30	0.07	0.57	4.0	5.0	43.7	0	12.3	0	4.1	0	3.0	23.3	0	0	1.9
12	4	16.1	0.39	0.08	0.69	3.9	5.7	43.6	0	12.5	0	4.0	0	2.6	22.0	0	0	2.8
20	2	10.0	0.39	0.07	0.56	4.8	5.8	36.8	0	16.2	0	3.0	0	2.8	23.7	0	0	3.8
20	4	15.0	1.14	0.18	1.30	5.5	6.1	35.7	0	19.1	0	2.7	0	3.3	21.7	0	0	2.9
28	2	10.0	0.27	0.04	0.22	1.0	5.1	53.7	0	15.2	0	3.2	0	2.0	12.3	0	0	4.4
28	4	15.4	0.83	0.16	0.77	9.3	7.3	42.6	0	13.5	0	2.5	0	2.6	12.4	0	0	6.1

* LA: リノール酸、18:2(ω9): 6,9-オクタデカジエン酸、GLA: ガンマリノレン酸、20:2(ω9): 8,11-エイコサジエン酸、20:3(ω9): ミード酸、DGLA: ジホモガンマリノレン酸、Ara: アラキドン酸、EPA: エイコサペンタエン酸

【0019】実施例2. グルコース2%及び酵母エキス1%を含む培地 (pH6. 0) 2. 5 lを5 lのジャーファーメンターに入れ、120℃で30分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) の突然変異株SAM1861の前培養液40mlを接種し、20℃、24℃、28℃の3通りの温度で通気量1vvm、7日間の通気攪拌培養を行なった。培養2日目から5日目まで毎日1%のグルコースを添加し

た。培養終了後、各々の得られた菌体について、実施例1のそれぞれの反応試薬量を500倍にした条件で同様にメチルエステル化し一部をとってガスクロマトグラフィーで分析した。表2にその結果を示す。
【0020】
【表2】

表 2

モルティエラ・アルピナSAM1861

培養 温度 (℃)	生育度 (g/l)	ω 9 PUFA生産量 (g/l)		脂肪酸組成 (%)														
		18:2 (ω9)	20:2 (ω9)	20:3 (ω9)	16:0	18:0	18:1	LA (ω9)	18:2 (ω9)	GLA (ω9)	20:1	20:2	20:2 (ω9)	20:3	DGLA (ω9)	Ara	EPA	24:0
20	14.4	0.70	0.15	0.72	6.4	11.0	46.3	0	11.1	0	0.9	0	2.3	11.3	0	0	0	4.9
24	16.6	0.86	0.21	0.70	7.1	11.0	46.6	0	11.3	0	0.9	0	2.8	9.2	0	0	0	5.6
28	14.5	0.53	0.16	0.32	10.2	11.1	49.8	0	8.6	0	0.9	0	2.6	5.2	0	0	0	6.0

20

30

40

10

【0021】6, 9-オクタジエン酸、8, 11-エイ
コサジエン酸、5, 8, 11-エイコサトリエン酸（ミ
ード酸）を、得られた脂肪酸メチルエステルを逆相カラ
ム（5C18）、溶離液アセトニトリル-水（85：1
5）を使って高速液体クロマトグラフィーで分取するこ
とにより単離した。それぞれ、質量分析、NMR分析等
により、構造 同定、確認した。

実施例3. グルコース2%、酵母エキス1%に、第3表
に示したオメガ9系高度不飽和脂肪酸の前駆体またはそ
れを含む油脂をそれぞれ0. 5%添加した培地（pH6.
0）を用いて、モルティエラ・アルピナの突然変異株
SAM1861を用いて実施例1と同様の方法で培養を
実施した。表3にその結果を示す。

【0022】

【表3】

表 3

添加物	ω 9 P U F A * 生産量 (g/l)		
	18 : 2	20 : 2	20 : 3
無添加	0.25	0.04	0.23
ヘキサデカン	0.35	0.06	0.34
オクタデカン	0.41	0.06	0.41
パルミチン酸	0.43	0.07	0.44
ステアリン酸	0.51	0.07	0.50
オレイン酸	0.62	0.11	0.60
パルミチン酸ナトリウム	0.38	0.08	0.38
ステアリン酸ナトリウム	0.40	0.08	0.40
オレイン酸ナトリウム	0.53	0.09	0.52
パルミチン酸メチル	0.48	0.10	0.49
ステアリン酸メチル	0.56	0.11	0.55
オレイン酸メチル	0.71	0.16	0.70
オレイン酸エチル	0.72	0.15	0.71
パーム油	0.49	0.08	0.48
オリーブ油	0.52	0.12	0.50
ヤシ油	0.39	0.07	0.35

* 18 : 2 ; 9, 12-オクタジエン酸

20 : 2 ; 8, 11-エイコサジエン酸

20 : 3 ; 5, 8, 11-エイコサトリエン酸 (ミード酸)

【手続補正書】

【提出日】平成4年8月12日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】

【具体的な説明】本発明の方法においては、オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。さらに具体的には、Δ5不飽和化活性およびΔ6不飽和化活性を有しかつΔ12不飽和化活性の低下または欠失した微生物を使用することができ、例えばアラキドン酸生産能を有する微生物から誘導される突然変異株を挙げることができる。アラキドン酸生産能を有する微生物としては、モルティエラ (*Mortierella*) 属、コニディオボラス (*Conidiobolus*) 属、フィチウム (*Pythium*) 属、フィトフトラ (*Phytophthora*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、クラドスポリウム (*Cladosporium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ロードトルラ (*Rhodotorula*) 属、エン

トモフトラ (*Entomophthora*) 属に属する菌株が挙げられる。モルティエラ属では例えば、モルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*)、モルティエラ・エキシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 等のモルティエラ亜属に属する菌株を挙げることができる。突然変異を誘発させるためには、放射線 (X線、ガンマー線、中性子線) 照射や紫外線照射、高熱処理等を行ったり、また微生物を適当なバッファー中などに懸濁し、変異源を加えて一定時間インキュベート後、適当に希釈して寒天培地に植菌し、変異株のコロニーを得るといった一般的な突然変異操作を行うこともできる。変異源としては、ナイトロジェンマスタード、メチルメタンサルホネート (MM S)、N-メチル-N'-ニトロソ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等のアルキル化剤や、5-βプロモウラシル等の塩基類似体や、マイトマイシンC等の抗生物質や、6-メルカプトプリン等の塩基合成阻害剤や、プロフラビン等の色素類 (その他の誘導体) や、4-ニトロキノリン-N-オキシド等のある種の発がん剤や塩化マンガン、ホルムアルデヒド等のその他の化合物を挙げる

ことができる。また使用する微生物は、生育菌体（菌糸など）でも良いし、孢子でも良い。またモルティエラ属の変異株では例えば、本発明者らが誘導した突然変異株モルティエラ・アルピナSAM1861（微工研条寄第3590号，FERM BP-3590）を使用することができる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】培養温度は5～40℃、好ましくは20～30℃とし、培地のpHは4～10、好ましくは6～9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2～10日間行う。固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50～100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5～40℃、好ましくは20～30℃の温度において、3～14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。また、本発明においては、オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物の培地中に、オメガ9系高度不飽和脂肪酸の基質を添加して培養することにより、オメガ9系高度不飽和脂肪酸の蓄積を促進することもできる。テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸等の脂肪酸又はその塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）及びエステル、又は脂肪酸が構成成分として含まれる油脂

（例えば、オリーブ油、ヤシ油、パーム油）等を挙げることができるが、これらに限られるものではない。基質の総添加量は培地に対して0.001～10重量%、好ましくは0.5～10重量%である。これらの基質は生産微生物を接種する前又はその直後に加えてもよく、又は培養を開始した後に加えてもよく、あるいは両時点に加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。又、これらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】

【実施例】

実施例1. グルコース2%または4%及び酵母エキス1%を含む培地（pH6.0）2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ（Mortierella alpina）の突然変異株SAM1861を培地に1白金耳接種し、レシプロシェーカー（110rpm）により、12℃、20℃、28℃の3種類の温度で10日間培養した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】実施例2. グルコース2%及び酵母エキス1%を含む培地（pH6.0）2.5lを5lのジャーファーマンターに入れ、120℃で30分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ（Mortierella alpina）の突然変異株SAM1861の前培養液40mlを接種し、20℃、24℃、28℃の3通りの温度で通気量1vvm、7日間の通気攪拌培養を行なった。培養2日目から5日目まで毎日1%のグルコースを添加した。培養終了後、各々の得られた菌体について、実施例1のそれぞれの反応試薬量を500倍にした条件で同様にメチルエステル化し一部をとってガスクロマトグラフィーで分析した。表2にその結果を示す。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正内容】

【0021】6,9-オクタジエン酸、8,11-エイコサジエン酸、5,8,11-エイコサトリエン酸（ミード酸）を、得られた脂肪酸メチルエステルを逆相カラム（5C18）、溶離液アセトニトリル-水（85:15）を使って高速液体クロマトグラフィーで分取することにより単離した。それぞれ、質量分析、NMR分析等により、構造を同定、確認した。

実施例3. グルコース2%、酵母エキス1%に、第3表に示したオメガ9系高度不飽和脂肪酸の前駆体またはそれを含む油脂をそれぞれ0.5%添加した培地（pH6.0）を用いて、モルティエラ・アルピナの突然変異株SAM1861を用いて実施例1と同様の方法で培養を実施した。表3にその結果を示す。

【手続補正書】

【提出日】平成4年10月29日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】オメガ9系高度不飽和脂肪酸を有する微生物を培養して得られるオメガ9系高度不飽和脂肪酸は、例えば6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、5, 8, 11-エイコサトリエン酸（ミード酸）等を挙げることができる。本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティプリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。その他必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の成育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1～30重量%、好ましくは1～10重量%、窒素源は0.01～5重量%、好ましくは0.1～2重量%の濃度とするのが良い。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。メタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混合溶媒を使用す

る。その他の手順は上記と同様である。上記のようにして得られた脂質中には、各種オメガ9系高度不飽和脂肪酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えば8, 11-エイコサジエン酸メチル、9, 12-オクタデカジエン酸メチル、ミード酸メチル等として分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸等（これらも、オメガ9系高度不飽和脂肪酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、オメガ9系高度不飽和脂肪酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水エタノール-塩酸5～10%、BF₃-メタノール10～50%等により、室温にて1～24時間処理するのが好ましい。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、遠心エバポレーター（60℃、2時間）で乾燥させ、そして、その乾燥菌体に塩化メチレン2ml、無水メタノール-塩酸（10%）2ml加え、50℃で3時間処理することによってメチルエステル化し、n-ヘキサン4ml、水1mlを加え、2回抽出し、抽出液の溶媒を遠心エバポレーター（40℃、1時間）で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表1にその結果を示す。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】

【表1】

表 1

モルティエラ・アルピナSAM1861

培養 温度 (℃)	グルコース 濃 度 (%)	生育度 (g/l)	ω 9 PUFA生産量 (g/l)		* 脂肪酸組成 (%)													
			18:2 (ω9)	20:3 (ω9)	16:0	18:0	18:1	LA	18:2 (ω9)	GLA	20:1	20:2 (ω9)	20:3 (ω9)	DGLA	Ara	EPA		
12	2	11.1	0.30	0.07	0.57	4.0	5.0	43.7	0	12.3	0	4.1	0	3.0	23.3	0	0	1.9
12	4	16.1	0.39	0.08	0.69	3.9	5.7	43.6	0	12.5	0	4.0	0	2.6	22.0	0	0	2.8
20	2	10.0	0.39	0.07	0.56	4.8	5.8	36.8	0	16.2	0	3.0	0	2.8	23.7	0	0	3.8
20	4	15.0	1.14	0.18	1.30	5.5	6.1	35.7	0	19.1	0	2.7	0	3.3	21.7	0	0	2.9
28	2	10.0	0.27	0.04	0.22	1.0	5.1	53.7	0	15.2	0	3.2	0	2.0	12.3	0	0	4.4
28	4	15.4	0.83	0.16	0.77	9.3	7.3	42.6	0	13.5	0	2.5	0	2.6	12.4	0	0	6.1

* LA: リノール酸、 18:2(ω9): 6,9-オクタデカジエン酸、 GLA: ガンマリノレン酸、 20:2(ω9): 8,11-エイコサジエン酸、
20:3(ω9): ミード酸、 DGLA: ジホモガンマリノレン酸、 Ara: アラキドン酸、 EPA: エイコサペンタエン酸、
20:1:11-オクタデセン酸、 20:2:11,14-エイコサジエン酸、 24:0: リグノセリン酸

【手続補正5】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0022
【補正方法】 変更

【補正内容】
【0022】
【表3】

表 3

添加物	ω 9 P U F A * 生産量 (g/l)		
	18 : 2	20 : 2	20 : 3
無添加	0.25	0.04	0.23
ヘキサデカン	0.35	0.06	0.34
オクタデカン	0.41	0.06	0.41
パルミチン酸	0.43	0.07	0.44
ステアリン酸	0.51	0.07	0.50
オレイン酸	0.62	0.11	0.60
パルミチン酸ナトリウム	0.38	0.08	0.38
ステアリン酸ナトリウム	0.40	0.08	0.40
オレイン酸ナトリウム	0.53	0.09	0.52
パルミチン酸メチル	0.48	0.10	0.49
ステアリン酸メチル	0.56	0.11	0.55
オレイン酸メチル	0.71	0.16	0.70
オレイン酸エチル	0.72	0.15	0.71
パーム油	0.49	0.08	0.48
オリーブ油	0.52	0.12	0.50
ヤシ油	0.39	0.07	0.35

* 18 : 2 ; 6, 9 - オクタデカジエン酸

20 : 2 ; 8, 11 - エイコサジエン酸

20 : 3 ; 5, 8, 11 - エイコサトリエン酸 (ミード酸)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

(C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:80)

(C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:66)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所